



12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer : **92890067.9**

51 Int. Cl.⁵ : **A61K 39/395, A61K 37/02**

22 Anmeldetag : **24.03.92**

30 Priorität : **25.03.91 AT 651/91**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung :
30.09.92 Patentblatt 92/40

84 Benannte Vertragsstaaten :
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

71 Anmelder : **IMMUNO Aktiengesellschaft**
Industriestrasse 67
A-1221 Wien (AT)

72 Erfinder : **Eibl, Johann, Dr.**
Gustav-Tschermakgasse 2
A-1180 Wien (AT)
Erfinder : **Eibl, Martha, Prof. Dr.**
Gustav-Tschermakgasse 2
A-1180 Wien (AT)
Erfinder : **Linnau, Yendra, Dr.**
Lavendelweg 24
A-1224 Wien (AT)

74 Vertreter : **Wolfram, Gustav et al**
Patentanwälte Sonn, Pawloy, Weinzing &
Wolfram Riemergasse 14
A-1010 Wien (AT)

54 **Pharmazeutische Präparation auf Basis von Plasmaproteinen.**

57 Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Präparation mit antimikrobieller, antiphlogistischer bzw. antiallergischer Wirkung auf Basis von Plasmaproteinen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin G (IgG) und Transferrin enthalten sind, wobei pro Gewichtsteil IgA zwischen 0,40 und 0,80 Gewichtsteile IgG und zwischen 0,15 und 0,45 Gewichtsteile Transferrin vorliegen.

Es hat sich gezeigt, daß sowohl die Stärke der Wirkung auf bakterielle und virale Erreger, als auch das Wirkungsspektrum einer IgA- und IgG - hältigen Präparation vergrößert werden kann, wenn sie noch zusätzlich Transferrin enthält und die drei Komponenten IgA, IgG und Transferrin in den erfindungsgemäßen Gewichtsverhältnissen vorliegen.

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Präparation mit antimikrobieller, antiphlogistischer bzw. antiallergischer Wirkung auf Basis von Plasmaproteinen.

Pharmazeutische Präparationen auf Basis von Immunglobulinen werden bereits zur Prophylaxe und Behandlung bakterieller und viraler Infektionen verwendet. In der US-A- 4 335 099 beispielsweise wird ein oral verabreichbares Präparat beschrieben, das Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin G (IgG) enthält und das sich zur Behandlung von Darminfektionen eignet. Es ist weiters bekannt, daß eine Immunglobulin-Präparation mit einem IgG- und IgA-Anteil am Gesamtglobulin von 73 bzw. von 26 % bei prophylaktischer Verabreichung an Frühgeborene die Gefahr einer Erkrankung an nekrotisierender Enterocolitis mindern kann (Martha M. Eibl et al., New Journal of Medicine, 319, S. 1 - 7, 1988).

Es wurde auch nachgewiesen, daß Serum eine bakterio statische Wirkung auf Staphylococcus aureus aufweist, wobei diese Wirkung von einer Sättigung des im Serum enthaltenen Siderophilins (Transferrins) mit Eisen abhängt (Arthur L. Schade, Protides Biolog. Fluids; Proc. Colloq. 1961, 8, S. 261 - 263). Diese mit Eisen angereicherte Serum- Probe enthält pro Gewichtsteil IgA 15 Gewichtsteile IgG und 2,6 Gewichtsteile Transferrin und wirkt nur gegen wenige Erreger.

Auch alle bekannten IgA - h ältigen pharmazeutischen Präparationen haben ein relativ schmales Wirkungsspektrum.

Die Erfindung setzt sich zum Ziel, eine pharmazeutische Präparation mit antimikrobieller Wirkung auf Basis von Plasmaproteinen zur Verfügung zu stellen, die ein breites Wirkungsspektrum aufweist. Außerdem soll diese Präparation auch eine antiphlogistische und antiallergische Wirkung besitzen.

Die erfindungsgemä ße pharmazeutische Präparation ist dadurch gekennzeichnet, daß sie Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin G (IgG) und Transferrin enthält, wobei pro Gewichtsteil IgA zwischen 0,40 und 0,80 Gewichtsteile IgG und zwischen 0,15 und 0,45 Gewichtsteile Transferrin vorgesehen sind.

Es hat sich gezeigt, daß sowohl die Stärke der Wirkung auf bakterielle und virale Erreger, als auch das Wirkungsspektrum einer IgA- und IgG - h ältigen Präparation vergrößert werden kann, wenn sie noch zusätzlich Transferrin enthält und die drei Komponenten IgA, IgG und Transferrin in den erfindungsgemä ßen Gewichtsverhältnissen vorliegen. Diese Verhältnisse sind jenen in der Muttermilch und im Kolostrum vergleichbar.

In der erfindungsgemä ßen Präparation liegt das IgA bevorzugt in einer Form vor, in der es das sogenannte "Secretory Piece" enthält, ein Protein, das dem IgA die Fähigkeit verleiht, Schleimhaut zu durchdringen.

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemä ßen Präparation ist dadurch gekennzeichnet, daß sie pro Milliliter applikationsbereiter Lösung zwischen 10 und 100 mg IgA, zwischen 4 und 80 mg IgG und zwischen 1,5 und 45 mg Transferrin enthält.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemä ßen pharmazeutischen Präparation ist durch eine oder mehrere Produktionsstufen erhältlich, in welchen infektiöse Agentien, insbesondere Viren, inaktiviert bzw. entfernt wurden.

Die erfindungsgemä ße Präparation eignet sich insbesondere zur Prophylaxe und Therapie von Schleimhautinfektionen, insbesondere von nekrotisierender Enterocolitis, von Entzündungen und Allergien. Sie kann außerdem Muttermilch in ihrer Funktion bei der Vermittlung von humoraler Immunität an Säuglinge ersetzen.

Zur Herstellung der erfindungsgemä ßen Präparation können handelsübliches IgA und IgG, handelsübliche IgA/IgG-Mischpräparate und handelsübliches Transferrin verwendet werden.

Ein bevorzugtes Herstellungsverfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß

- eine IgA, IgG und Transferrin enthaltende Plasmafraktion zur Inaktivierung von infektiösen Agentien behandelt oder in unbehandelter Form mit einem Ionenaustauscher in Kontakt gebracht wird, um IgA, IgG und Transferrin zu adsorbieren,
- das am Ionenaustauscher adsorbierte IgA, IgG und Transferrin gewaschen und eluiert wird,
- das Eluat einer Reinigungsfällung zur Abtrennung unerwünschter Begleitproteine unterworfen wird, um eine gereinigte IgA-, IgG- und Transferrin-h ältige Lösung zu erhalten,
- die erhaltene Lösung mit einem Proteinfällungsmittel behandelt wird, um IgA, IgG und Transferrin zu fällen und um eine Vorinaktivierung eventuell vorhandener infektiöser Agentien zu bewirken,
- das gefällte IgA, IgG und Transferrin abgetrennt, gefriergetrocknet, zur weiteren Inaktivierung infektiöser Agentien behandelt und schließlich in an sich bekannter Weise zu einer oral, parenteral oder topisch anwendbaren pharmazeutischen Präparation aufgearbeitet wird.

Es hat sich gezeigt, daß es während der genannten Verfahrensschritte zu einer Reduktion eines im Ausgangsmaterial eventuell vorhandenen Titers an infektiösen Agentien, wie Viren, kommt. Dieser Effekt ist dann besonders ausgeprägt, wenn die erfindungsgemä ße Präparation hergestellt wird, indem

- Plasma oder Plasmafraktionen nach der Methode von Cohn mit Äthanol behandelt werden, um die Cohn II+III - Fraktion abzutrennen,
- die abgetrennte Cohn II+III - Fraktion mit einem wässerigen Puffer bei einem pH zwischen 5,0 und 6,5 digeriert wird, um ein Proteingemisch enthaltend IgA, IgG und Transferrin zu extrahieren,

- das extrahierte Proteingemisch mit Äthanol versetzt wird, um unerwünschte Begleitproteine zu fällen,
- die gefällten Begleitproteine abgetrennt werden, um eine IgA-, IgG- und Transferrin enthaltende Lösung zu erhalten,
- diese IgA, IgG und Transferrin enthaltende Lösung mit einem DEAE - Ionenaustauscher in Kontakt gebracht wird, um IgA, IgG und Transferrin zu adsorbieren,
- das adsorbierte IgA, IgG und Transferrin gewaschen und eluiert wird,
- das erhaltene Eluat mit Äthanol behandelt wird, um IgA und IgG zu fällen,
- das gefällte IgA und IgG abgetrennt wird, um einen IgA- und IgG-hältigen Niederschlag und einen Transferrin-hältigen Überstand zu erhalten,
- der Überstand angesäuert wird, um Transferrin zu fällen,
- das gefällte Transferrin abgetrennt wird,
- die abgetrennten Niederschläge vereinigt und zu einer pharmazeutischen Präparation fertiggestellt werden.

Diese Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens führt bei eventueller Anwesenheit von infektiösen Agentien im Ausgangsmaterial zu einer Reduktion des Titors von mindestens 29 Logarithmuseinheiten.

Nachstehend werden die Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation und ihre Wirksamkeit näher beschrieben.

Herstellung

Beispiel 1

100 l gefrorenes Humanplasma werden aufgetaut, der Niederschlag (Kryopräzipitat) abgetrennt und der Überstand (Kryoüberstand) bei -2°C und einem pH-Wert von 7,0 mit Äthanol bis zu einer Konzentration von 8 % versetzt. Nach Abtrennung des dabei entstehenden Niederschlages wird die Äthanol-Konzentration des Überstandes bei -5°C auf 25 % erhöht. Der dabei ausfallende Niederschlag (Cohn II+III-Fraktion) wird mit einem Phosphat-Acetat-Puffer extrahiert und mit 12 % Äthanol bei einem pH-Wert von 5,3 und einer Temperatur von -2°C versetzt, wobei sich ein Niederschlag bildet, der abgetrennt wird. Der Überstand wird bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 6,5 mit einem Anionenaustauscher wie DEAE - Sephadex behandelt, um IgA, teilweise IgG und Transferrin zu adsorbieren. Adsorbiert werden auch noch andere Proteine wie Albumin.

Zur Entfernung der nicht gebundenen Proteine wird gewaschen, wobei über die Intensität des Waschschrittes das Verhältnis von IgA zu IgG im Endprodukt beeinflusst werden kann. Danach werden die adsorbierten Proteine mit einer phosphatgepufferten, 3 %-igen NaCl-Lösung eluiert. Die erhaltene Lösung wird bei einem pH-Wert zwischen 6,4 und 6,5 und einer Temperatur von -3°C mit 20 % Äthanol versetzt, der sich dabei bildende Niederschlag verworfen und im Überstand die Äthanolkonzentration auf 30 % erhöht, wobei IgA, IgG und Transferrin ausfallen.

Dieser Niederschlag wird abgetrennt, in Wasser gelöst, und bei einem pH-Wert von 6,5 und einer Temperatur von -5°C mit 25 % Äthanol versetzt. Das sich dabei bildende Präzipitat enthält IgA und IgG und wird abgetrennt. Transferrin bleibt in Lösung und wird durch Einstellen des pH-Wertes auf 5,5 gefällt.

Dann werden in den Niederschlägen nach bekannten Methoden die Gehalte an IgA, IgG und Transferrin bestimmt und durch Zusammenmischen der entsprechenden Mengen die erfindungsgemäße Zusammensetzung eingestellt, wobei gegebenenfalls IgA, IgG und/oder Transferrin mit handelsüblichen Präparaten ergänzt und noch pharmazeutische Zusatzstoffe zugegeben werden können.

Anschließend wird die Lösung gefriergetrocknet, mit Wasser befeuchtet und 10 Stunden bei 60°C hitzebehandelt, um eventuell vorhandene Krankheitserreger abzutöten.

Um das gefriergetrocknete, hitzebehandelte Pulver in eine applizierbare Form zu bringen, kann es entweder in einer NaCl-hältigen Glukoselösung gelöst, sterilfiltriert und abgefüllt werden, oder es kann zur oralen Verabreichung tablettiert oder in Kapseln gefüllt werden, wobei jedoch Tabletten und Kapseln mit einer magensaftresistenten Schicht überzogen werden müssen.

Beispiel 2

10 l Humanplasma werden mit 140 g Ammoniumsulfat pro Liter bei pH 7,2 versetzt. Nach Abtrennung des Niederschlages wird die Ammoniumsulfatkonzentration auf 275 g/l erhöht. Der dabei ausfallende Niederschlag wird in einem 5 mMol/l Azetatpuffer bei pH 5,0 gelöst, der unlösliche Anteil abgetrennt und verworfen. Aus dem Überstand wurden IgA, IgG und Transferrin isoliert und durch Ausfällung mit 30 % Äthanol bei pH 6,6 und -5°C konzentriert.

Das Präparat besitzt folgende Zusammensetzung:

IgA	63 mg/ml
IgG	28 mg/ml
Transferrin	10 mg/ml

5 Reduktion des Virus-Titers

Zur Dokumentation der Inaktivierung bzw. der Entfernung eventuell im Ausgangsplasma vorhandener Viren während der Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation, wurden die im Beispiel 1 beschriebenen Verfahrensschritte wiederholt, wobei vor jedem einzelnen Verfahrensschritt in der Probe ein bestimmter Virus-Titer (HIV) eingestellt und nach Durchführung der Verfahrensschritte bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Schritt 1: Gewinnung des Kryopräzipitats

15 10 ml humanes Plasma wurden mit 1 ml einer HIV-1-Virussuspension, enthaltend 10^6 Infektionseinheiten pro 0,5 ml (Virussuspension I) versetzt. Die Mischung wurde bei -20 °C eingefroren und zwischen 0 bis 2 °C aufgetaut. Der gebildete Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Im Überstand (Kryoüberstand) wurde der Virustiter mit 10^4 Infektion Einheiten/ml bestimmt. Im Verfahrensschritt 1 wird somit eine Reduktion des Virus-Titers um eine Zehnerpotenz erreicht.

20 Schritt 2: Fraktionierung mit 8 % Äthanol

6 ml Kryoüberstand wurden mit 0,6 ml Virus Suspension I versetzt. Die Temperatur der Mischung wurde bei -1 bis -2 °C gehalten und 0,6 ml eines 96 %igen Äthanol (-20 °C) zugesetzt, sodaß eine 8 %ige Äthanolkonzentration vorliegt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Im Überstand wurde die Viruskonzentration mit 10^3 Infektion Einheiten/ml bestimmt, was eine Reduktion um den Faktor 10^2 bedeutet.

Schritt 3: Trennung des Albumins von den Immunglobulinen

30 8 ml des Überstandes von Schritt 2 wurden mit 0,8 ml einer HIV-1-Virussuspension, enthaltend 10^7 Infektionseinheiten pro 0,5 ml (Virussuspension II) versetzt. Die Temperatur der Mischung wurde bei -5 °C gehalten und 2,1 ml einer 96 %igen Äthanollösung zugesetzt um eine 25 %ige Lösung zu bekommen. Der gebildete Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Im gelösten Niederschlag (in 1 ml PBS) konnte kein Virus nachgewiesen werden, was einer Reduktion um den Faktor 10^6 bedeutet.

Schritt 4: Extraktion und Fällung mit 12 % Äthanol

40 1 g des im Schritt 3 erhaltenen Niederschlags wurde in 30 ml Phosphat-Acetat-Puffer suspendiert. 10 ml dieser Suspension wurde mit 1 ml der Virussuspension I versetzt. Bei einer Temperatur von -2 °C wurden 1,6 ml einer 96 %igen Äthanollösung zugesetzt, wobei die Endkonzentration 12 % Masse betrug. Diese Suspension wurde zentrifugiert. Im Verstand konnte kein Virus nachgewiesen werden, was einer Reduktion um den Faktor 10^5 entspricht.

45 Schritt 5: Adsorption, Waschung, Eluation

Zu 10 ml des Überstandes vor Schritt 4 wurden 500 mg DEAE-Sephadex pro Gramm Protein zugesetzt, mit 1 ml der Virussuspension II versetzt, bei -2 °C gerührt und das Adsorbat abgetrennt; das Sephadex wurde gewaschen und die Proteine eluiert. Der Virus Titer betrug 10^3 Infektionseinheiten pro ml, was einer Reduktion um den Faktor 10^3 entspricht.

Schritt 6: Fällung mit 20 % Äthanol

55 5 ml des Eluates aus Schritt 5 wurden mit 0,5 ml Virussuspension II versetzt, 1,45 ml einer 96 %igen Äthanollösung zugesetzt, bei -2 °C gerührt und der Niederschlag abzentrifugiert. Im Überstand konnte kein Virus nachgewiesen werden (Reduktion: 10^6).

Schritt 7: Fällung mit 30 % Äthanol

5 ml Überstand aus Schritt 6 wurden mit 0,5 ml Virussuspension II und 0,83 ml Äthanol versetzt, bei -5 °C gerührt und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 ml Puffer gelöst. Es konnte kein Virus nachgewiesen werden (Reduktion: 10^6).

Die gesamte Virustiter-Reduktion (Summe der Verfahrensschritte 1 bis 7) betrug somit mindestens 10^{29} (siehe Tabelle).

Tabelle 1: Reduktion des Virustiters

Verfahrens- schritt	Virus Titer Inf.Einh/ml vor Verfahrensschritt	Reduktion des Virus-Titer nach Verfahrensschritt	
1	10^5	10^4	10^1
2	10^5	10^3	10^2
3	10^6	0	10^6
4	10^5	0	$> 10^5$
5	10^6	10^3	10^3
6	10^6	0	$> 10^6$
7	10^6	0	$> 10^6$
Gesamte Virustiter-Reduktion			> 29 =====

Wirksamkeit gegen Bakterien

Zur Prüfung auf Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Präparation auf Bakterien wurden drei Lösungen (a, b und c) der in Tab. 2 angegebenen Zusammensetzung verwendet:

Tabelle 2

<u>Lösung</u>	<u>IgA</u>	<u>IgG</u>	<u>Transferrin</u>
a	50	30	15
b	25	20	11
c	90	40	15

(Zahlenangaben in mg/ml)

3 ml der jeweiligen Lösung a, b und c wurden in Röhrchen mit je 0,1 ml verschiedener Bakteriensuspensionen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* und *Candida albicans* geimpft, geschüttelt, 2 x 0,1 ml in Petrischalen pipettiert und mit Nutrientagar bzw. für *Candida* mit Sojabohnen Caseinagar ausgegossen.

Nach einer Inkubationszeit von 0,5; 1; 3; 5 und 24 Stunden bei 20 bis 25°C wurden die Kolonien ausgezählt. Alle drei Präparationen a, b und c hemmten das Wachstum aller fünf Bakterien. Nur bei Lösung b war die Wachstumshemmung auf *E. coli* schwach ausgeprägt.

Zum Vergleich wurden die Wirkungen von Albumin, drei IgA/IgG-Mischungen und von Transferrin getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3

	<u>Staph. aur.</u>	<u>E.coli</u>	<u>Pseud. aerug.</u>	<u>Bac.sub.</u>	<u>cand.alb.</u>
Albumin (50mg);	-	-	-	-	-
IgA (56mg) IgG (2mg);	-	+	-	-	-
IgA (75mg) IgG (26mg);	+	-	-	-	+
IgA (3mg) IgG (100mg);	-	-	-	+	-
Transferrin (56mg);	-	-	+	-	-
Transferrin (15mg);	-	-	-	-	-
Die Zahlen beziehen sich auf mg pro Milliliter Lösung					
- : keine Hemmung des Bakterienwachstums					
+ : Hemmung des Bakterienwachstums					

Wirksamkeit gegen Viren

Zur Feststellung der Wirkung der erfindungsgemäßen Präparation auf Viren wurden je 1 ml der oben beschriebenen Lösung a mit 0,1 ml HIV-, Sindbis- und VSV-Virussuspension versetzt, gefriergetrocknet, befeuchtet und 10 Stunden bei 60°C in verschlossenen Behältnissen erhitzt, wobei vor und nach der Hitzebehandlung der Virustiter bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Virus	Virus-Titer	
	vor Beginn der Behandlung	nach 10 Stunden
Sindbis	10^5	$< 10^{0,5}$
VSV	$10^{4,4}$	$< 10^{0,5}$
HIV	10^4	$< 10^{0,5}$

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Präparation mit antimikrobieller, antiphlogistischer bzw. antiallergischer Wirkung auf Basis von Plasmaproteinen, dadurch gekennzeichnet, daß die Präparation Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin G (IgG) und Transferrin enthält, wobei pro Gewichtsteil IgA zwischen 0,40 und 0,80 Gewichtsteile IgG und zwischen 0,15 und 0,45 Gewichtsteile Transferrin vorgesehen sind.
2. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das IgA das "Secretory Piece" enthält.
3. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie pro Milliliter applikationsfertiger Lösung zwischen 10 und 100 mg, vorzugsweise zwischen 45 und 55 mg, IgA, zwischen 4 und 80 mg, vorzugsweise zwischen 25 und 35mg, IgG und zwischen 1,5 und 45 mg, vorzugsweise zwischen 10 und 20 mg, Transferrin enthält.
4. Pharmazeutische Präparation nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, erhältlich durch eine oder mehrere Produktionsstufen, in welchen infektiöse Agentien, insbesondere Viren, inaktiviert bzw. entfernt wurden.
5. Pharmazeutische Präparation nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 zur Prophylaxe und Therapie von Schleimhautinfektionen, insbesondere von nekrotisierender Enterocolitis, von Entzündungen und Allergien.
6. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Kombination der Maßnahmen, daß
 - eine IgA, IgG und Transferrin enthaltende Plasmafraktion zur Inaktivierung von infektiösen Agentien behandelt oder in unbehandelter Form mit einem Ionenaustauscher in Kontakt gebracht wird, um IgA, IgG und Transferrin zu adsorbieren,
 - das am Ionenaustauscher adsorbierte IgA, IgG und Transferrin gewaschen und eluiert wird,
 - das Eluat einer Reinigungsfällung zur Abtrennung unerwünschter Begleitproteine unterworfen wird, um eine gereinigte IgA-, IgG- und Transferrin-hältige Lösung zu erhalten,
 - die erhaltene Lösung mit einem Proteinfällungsmittel behandelt wird, um IgA, IgG und Transferrin zu fällen und um eine Vorinaktivierung eventuell vorhandener infektiöser Agentien zu bewirken,
 - das gefällte IgA, IgG und Transferrin abgetrennt, gefriergetrocknet, zur weiteren Inaktivierung infektiöser Agentien behandelt und schließlich in an sich bekannter Weise zu einer oral, parenteral oder topisch anwendbaren pharmazeutischen Präparation aufgearbeitet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß

- Plasma oder Plasmafraktionen nach der Methode von Cohn mit Äthanol behandelt werden, um die Cohn II+III - Fraktion abzutrennen,
- die abgetrennte Cohn II+III - Fraktion mit einem wässrigen Puffer bei einem pH zwischen 5,0 und 6,5 digeriert wird, um ein Proteingemisch enthaltend IgA, IgG und Transferrin zu extrahieren,
- das extrahierte Proteingemisch mit Äthanol versetzt wird, um unerwünschte Begleitproteine zu fällen,
- die gefällten Begleitproteine abgetrennt werden, um eine IgA-, IgG- und Transferrin enthaltende Lösung zu erhalten,
- diese IgA, IgG und Transferrin enthaltende Lösung mit einem DEAE - Ionenaustauscher in Kontakt gebracht wird, um IgA, IgG und Transferrin zu adsorbieren,
- das adsorbierte IgA, IgG und Transferrin gewaschen und eluiert wird,
- das erhaltene Eluat mit Äthanol behandelt wird, um IgA und IgG zu fällen,
- das gefällte IgA und IgG abgetrennt wird, um einen IgA- und IgG-hältigen Niederschlag und einen Transferrin-hältigen Überstand zu erhalten,
- der Überstand angesäuert wird, um Transferrin zu fällen,
- das gefällte Transferrin abgetrennt wird,
- die abgetrennten Niederschläge vereinigt und zu einer pharmazeutischen Präparation fertiggestellt werden.